

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Ульяновский государственный университет»

**Энзимология**  
методические указания к лабораторным занятиям и  
самостоятельной работе студентов

Ульяновск, 2019г

**УДК 611.018**

**ББК 28.06**

**Рецензенты:**

к.б.н., зав. каф.кафедрой биологии и химии  
Ульяновского государственного педагогического университета им. И.Н. Ульянова

*О.Е. Беззубенкова*

к.б.н., доцент кафедры биологии и химии  
Ульяновского государственного педагогического университета им. И.Н. Ульянова

*В.А. Михеев*

**Энзимология.** Методические указания к лабораторным занятиям и самостоятельной работе студентов

Методические указания составлены в соответствии с программой дисциплины «Энзимология» и предназначены для студентов экологического факультета направления подготовки 06.03.01«Биология». В методических указаниях приведены рекомендации по проведению и оформлению лабораторных работ, предусмотренных программой дисциплины, а также указания к самостоятельной работе студентов.

## СОДЕРЖАНИЕ

1. Цели и задачи освоения дисциплины:.....	4
2. Место дисциплины в структуре ОПОП ВО.....	4
3. Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине, соотнесенных с планируемыми результатами освоения основной профессиональной образовательной программы.....	4
4. Общая трудоемкость дисциплины.....	6
5. Содержание дисциплины. Распределение часов по темам и видам учебной работы.....	6
6. Темы лабораторных занятий.....	7
7. Самостоятельная работа обучающихся	15
8. Список рекомендуемой литературы.....	17

### **Цели и задачи освоения дисциплины:**

**Цели освоения дисциплины:** изучить фундаментальную роль ферментов (энзимов) в обмене веществ и энергии, молекулярных механизмах наследственности, регуляции и интеграции метаболических процессов в живых организмах.

### **Задачи освоения дисциплины:**

- ознакомление студентов с современными представлениями о структурной организации ферментов, механизмах ферментативного катализа, внутриклеточной локализации ферментов и их кинетических свойствах;
- регуляции активности ферментов *in vivo* и *in vitro*, использовании ферментов как эффективных биокатализаторов в медицине, промышленности, сельском хозяйстве.

### **Место дисциплины в структуре ОПОП ВО:**

- Дисциплина «Энзимология» является дисциплиной по выбору профессионального цикла дисциплин Федерального государственного образовательного стандарта высшего образования (ФГОС ВО) по направлению подготовки бакалавров 06.03.01 - «Биология»;
- Для изучения данной дисциплины необходимы базовые знания предшествующих общих профессиональных курсов (биохимия, молекулярная биология, общая биология, клеточная биология и др.);
- Дисциплина «Энзимология» является общим теоретическим и методологическим основанием для преддипломной практики, выполнения работы по написанию выпускной квалификационной работы, входящих в ООП бакалавра.

### **Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине, соотнесенных с планируемыми результатами освоения основной профессиональной образовательной программы**

Изучение дисциплины «Энзимология» в рамках освоения образовательной программы направлено на формирование у обучающихся следующих общекультурных, общепрофессиональных и профессиональных компетенций:

Код и наименование реализуемой компетенции	Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине, соотнесенных с индикаторами достижения компетенций
<p>ОПК-6 - способность применять современные экспериментальные методы работы с биологическими объектами в полевых и лабораторных условиях, навыки работы с современной аппаратурой</p>	<p><b>Знать:</b> методы анализа внутриклеточной локализации ферментов; основные типы регуляции активности ферментов; терминологию, используемую в энзимологии; особенности изменения кинетических свойств ферментов в присутствии активаторов и ингибиторов.</p> <p><b>Уметь:</b> использовать полученные знания при изучении других биологических дисциплин; применять полученные знания для постановки и проведения экспериментальной работы по исследованию активности, кинетических свойств ферментов, регуляции метаболических процессов в живых организмах.</p> <p><b>Владеть:</b> методами самостоятельного проведения экспериментов по заданной схеме, используя лабораторное оборудование и приборы.</p>
<p>ОПК- 11 - способность применять современные представления об основах биотехнологических и биомедицинских производств, генной инженерии, нанобиотехнологии, молекулярного моделирования</p>	<p><b>Знать:</b> вклад отечественных учёных в развитие энзимологии; кинетические свойства ферментов, предопределяющие их возможности в регуляции метаболизма у организмов различной степени сложности; структурную организацию ферментов, механизмы формирования каталитически активных конформаций активных центров ферментов; механизмы ферментативного катализа и современные методы изучения ферментативного катализа.</p> <p><b>Уметь:</b> применять полученные знания в биохимическом мониторинге окружающей среды, в оценке нарушений метаболических процессов при патологических состояниях; иметь опыт изучения энзиматических процессов как <i>in vivo</i>, так и <i>in vitro</i>; решать задачи по ферментативной кинетике.</p> <p><b>Владеть:</b> Методами и приемами современных биотехнологических и биомедицинских производств, генной инженерии, нанобиотехнологии, молекулярного моделирования</p>
<p>ПК-4 - способность применять современные методы обработки, анализа и синтеза полевой, производственной и лабораторной биологической информации, правила</p>	<p><b>Знать:</b> значение статистической обработки данных при проведении исследовательских работ, современные методы обработки, анализа и синтеза производственной и лабораторной биологической информации, правила составления научно-технических проектов и отчетов.</p> <p><b>Уметь:</b> применять методы статистической обработки данных, самостоятельно работать с литературными источниками, осуществлять сбор данных, анализировать полученные результаты, факты, цифровые данные, делать обоснованные выводы, формулировать научные результаты работы и практические рекомендации.</p> <p><b>Владеть:</b> медико-биологической статистики, методами сравнения</p>

составления научно-технических проектов и отчетов	структур организма и установления биологических особенностей специфики организации клеток, тканей, органов; методами обработки анализа и синтеза производственной и лабораторной биоинформации; техникой написания научно-исследовательской работы.
---	---

### Общая трудоемкость дисциплины

Объем дисциплины по видам учебной работы (в часах) 108

Вид учебной работы	Количество часов (форма обучения: очная)	
	Всего по плану	В т.ч. по семестрам
		6
Контактная работа обучающихся с преподавателем в соответствии с УП	57	57
Аудиторные занятия:		
лекции	-	-
семинары и практические занятия	-	-
лабораторные работы, практикумы	57	57
Самостоятельная работа	51	51
Форма текущего контроля знаний и контроля самостоятельной работы: тестирование, контр. работа, коллоквиум, реферат и др. (не менее 2 видов)		тестирование, собеседование
Курсовая работа	-	-
Виды промежуточной аттестации (экзамен, зачет)	зачет	зачет
Всего часов по дисциплине	108	108

### Содержание дисциплины. Распределение часов по темам и видам учебной работы:

Название и разделов и тем	Всего	Виды учебных занятий				
		Аудиторные занятия				Самостоятельная работа
		лекции	практические занятия, семинары	лабораторные работы	в т.ч. занятия в интерактивной форме	
1	2	3	4	5	6	7
Краткие исторические сведения о развитии энзимологии. Возникновение понятия "ферментация"		-	-	4	-	4
Значение энзимологии. Биологическая роль ферментов. Практическое применение ферментов		-	-	4	-	4

Методы исследования ферментов. Методы очистки и выделения		-	-	4	4	4
Строение ферментов. Химическая природа ферментов		-	-	5	-	5
Механизм действия ферментов. Общее понятие о катализе		-	-	5	3	5
Строение активного центра и механизм действия рибонуклеазы. Общая характеристика рибонуклеаз. Строение и механизм действия лизоцима.		-	-	5	3	5
Никотинамиддинуклеотидные дегидрогеназы. Флавиновые ферменты. Пиридоксальные ферменты		-	-	5	-	4
Основные понятия ферментативной кинетики		-	-	5	-	4
Влияние температуры и рН на скорость ферментативных реакций		-	-	5	3	4
Понятие "ингибитор", классификация ингибиторов		-	-	5	-	4
Регулирование активности ферментов		-	-	5	3	4
Номенклатура и классификация ферментов		-	-	5	3	4
ИТОГО	108/19 *	0	0	57	19	51
ВСЕГО	108/19 *	0	0	57	19	51

### Темы лабораторные занятия

#### Тема 1. Краткие исторические сведения о развитии энзимологии. Возникновение понятия "ферментация".

##### Вопросы к теме:

1. Открытие Кирхгофом ферментативного распада крахмала.
2. Получение первых ферментативных препаратов.
3. Возникновение представления о ферментах как катализаторах жизненных процессов.

4. Дискуссия между Ю. Либихом и Л. Пастером о природе ферментативного действия.
5. Опыты М. Манасеиной, братьев Бюхнеров и Л. Лебедева.
6. Последовательные этапы изучения химической природы ферментов, их физико-химических свойств и каталитического действия.
7. Последние достижения в изучении ферментов. Значение работ отечественных учёных в развитии энзимологии.

## **Тема 2. Значение энзимологии. Биологическая роль ферментов.**

### **Практическое применение ферментов.**

#### **Вопросы к теме:**

1. Применение ферментов в диагностике болезней и в качестве лечебных средств.
2. Молекулярные болезни.
3. Использование ферментов в промышленности.
4. Имобилизованные ферменты.
5. Инженерная энзимология.
6. Ферменты в сельском хозяйстве.
7. Перспективы использования ферментов.

## **Тема 3. Методы исследования ферментов.**

### **Методы очистки и выделения.**

#### **Вопросы к теме:**

1. Значение очистки ферментов.
2. Выбор источника для выделения ферментов.
3. Методы очистки: диализ, тепловая денатурация, высаливание, адсорбционная, распределительная и ионообменная хроматография, фильтрация через гели, афинная хроматография, электрофорез.
4. Получение кристаллических ферментов.
5. Критерии чистоты ферментативных препаратов.
6. Методы изучения ферментативной активности.
7. Методы исследования ферментативного действия в живой клетке и в её отдельных структурных элементах.
8. Способы выражения активности ферментов.

#### **Тема 4. Строение ферментов. Химическая природа ферментов.**

##### **Вопросы к теме:**

1. Строение ферментов.
2. Химическая природа ферментов.
3. Молекулярные массы ферментов-белков.
4. Одно- и двухкомпонентные ферменты.
5. Коферменты и простетические группы, их важнейшие представители.
6. Первичная, вторичная, третичная, четвертичная структура ферментов.
7. Принципы пространственной организации молекулы фермента, проблема сворачивания полипептидной цепочки в нативную конформацию, её важность для функционирования ферментов.
8. Роль мультидоменной организации молекулы фермента, значение подвижности доменов в катализе.
9. Активный центр, его строение и функция.
10. Функциональные группы ферментов.
11. Методы изучения строения активного центра.
12. Значение пространственной структуры в формировании активного центра.
13. Структурные основы реализации феномена индуцированного соответствия.

#### **Тема 5. Механизм действия ферментов. Общее понятие о катализе.**

##### **Вопросы к теме:**

1. Общее понятие о катализе.
2. Снижение энергии активации у различных филогенетических групп организмов.
3. Фермент-субстратный комплекс.
4. Природа сил, стабилизирующих различные конформационные состояния системы фермент-субстрат.
5. Доказательство образования фермент-субстратного комплекса.
6. Типы катализа, используемые в ферментативных реакциях.
7. Общий кислотно-основной катализ.
8. Ковалентный катализ.
9. Связывание субстрата в напряжённой конфигурации.
10. Эффект сближения ориентации.

11. Увеличение предэкспоненциального фактора в ферментативных реакциях.
12. Особенности ферментативного действия.

### **Тема 6. Строение активного центра и механизм действия рибонуклеазы.**

#### **Вопросы к теме:**

1. Общая характеристика рибонуклеаз.
2. Строение и механизм действия лизоцима.
3. Строение активного центра и механизм действия панкреатической рибонуклеазы. Общая характеристика рибонуклеаз.
4. Реакции, катализируемые рибонуклеазой.
5. Исследование активного центра рибонуклеазы. Механизм её действия.
6. Строение и механизм действия лизоцима. Субстраты, на которые действует лизоцим.
7. Гидролитическая и трансферазная активность лизоцима. Выяснение роли функциональных групп активного центра лизоцима. Возможные механизмы действия лизоцима.

### **Тема 7. Никотинамиддинуклеотидные дегидрогеназы. Флавиновые ферменты. Пиридоксальные ферменты.**

#### **Вопросы к теме:**

1. Механизм действия никотинамиддинуклеотидных дегидрогеназ. Типы, катализируемых реакций.
2. Роль кофермента и белковой части.
3. Химическая природа единиц, переносимых при окислении субстрата.
4. Представление о никотинамиддинуклеотидных, как о специализированных субстратах.
5. Типичные реакции дегидрогенизации, катализируемые флавинопротеидами.
6. Механизм действия флавиновых дегидрогеназ.
7. Полувосстановленные флавины.
8. Комплексы металлов с флавинами.
9. Реакции восстановленных флавинов с кислородом.

10. Аспаратаминотрансфераза.
11. Рацемизация, декарбоксилирование и процессы, связанные с превращениями в аминокислотных заместителях, специфичность действия пиридоксальных ферментов и свойств их кислотных центров.

### **Тема 8. Основные понятия ферментативной кинетики.**

#### **Вопросы к теме:**

1. Зависимость скорости ферментативных реакций от концентрации фермента и субстрата.
2. Значение изучения кинетики ферментативных реакций.
3. Основные понятия ферментативной кинетики.
4. Скорость реакции. Закон действия масс. Константы скорости реакции.
5. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента и субстрата.
6. Уравнение Михаэлиса-Ментен и его анализ. Понятие константы Михаэлиса и максимальной скорости, их значение при исследовании механизма ферментативных реакций, методы их определения. Механизмы двух субстратных реакций.

### **Тема 9. Влияние температуры и pH на скорость ферментативных реакций.**

#### **Вопросы к теме:**

1. Энергия активации.
2. Изменение свободной энергии для реакций различных типов.
3. Определение энергии активации для отдельных стадий преобразования и распада фермент-субстратного комплекса.
4. Термодинамические характеристики ферментативной реакции и фермент-субстратного комплекса. Определение изменения свободной энергии, энтальпии и энтропии.
5. Важность определения этих величин для понимания сущности процесса активации, механизма каталитического действия ферментов.
6. Кривая, выражающая зависимость скорости реакции от pH.
7. Оптимальная концентрация водородных ионов. Возможные механизмы влияния pH на активность ферментов.

8. Значение исследования влияния рН на скорость ферментативных реакций.
9. Определение констант диссоциации ионогенных групп активного центра ферментов.

### **Тема 10. Понятие "ингибитор", классификация ингибиторов.**

#### **Вопросы к теме:**

1. Кинетика ингибирования ферментов.
2. Понятие ингибитор, классификация ингибиторов.
3. Обратимые конкурентные и неконкурентные ингибиторы.
4. Необратимые ингибиторы.
5. Определение констант ингибирования.
6. Ингибирование субстратом и продуктами реакции.

### **Тема 11. Регулирование активности ферментов.**

#### **Вопросы к теме:**

1. Аллостерическая регуляция.
2. Кинетика действия аллостерических ферментов.
3. Объяснение аллостерического эффекта на молекулярном уровне.
4. Роль гормонов и цАМФ.
5. Ковалентная модификация ферментов.
6. Роль субклеточных структур в регуляции действия ферментов.
7. Проферменты.
8. Обратимость действия ферментов.
9. Изоферменты.
10. Ферментные системы.

### **Тема 12. Номенклатура и классификация ферментов.**

#### **Вопросы к теме:**

1. Номенклатура и классификация ферментов.
2. Принципы современной классификации и номенклатура ферментов.
3. Характеристика основных классов ферментов, их подклассов и подподклассов.

### Примерный перечень вопросов к зачету

1. Химическая природа ферментов. Молекулярная масса ферментных белков. Одно- и двухкомпонентные ферменты. Коферменты и простетические группы, их важнейшие представители.
2. Краткие исторические сведения о развитии энзимологии.
3. Термодинамические характеристики ферментативной реакции. Определение изменения свободной энергии, энтальпии и энтропии. Значение этих величин для понимания действия ферментов.
4. Различные уровни структурной организации ферментов и значение их для ферментативной активности.
5. Краткие исторические сведения о развитии энзимологии (4 этап).
6. Химическая иммобилизация ферментов.
7. Активный центр ферментов, его строение и функция. Методы изучения строения активного центра.
8. Последние достижения в изучении ферментов. Значение работ отечественных ученых в развитии энзимологии.
9. Физическая иммобилизация ферментов.
10. Значение третичной структуры в формировании активного центра. Гипотеза Кошланда об индуцированном структурном соответствии.
11. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. Уравнение
12. Михаэлиса-Ментена и его анализ.
13. Класс лиаз.
14. Общее представление о механизме действия ферментов. Общее понятие о катализе. Снижение энергии активности при ферментативном катализе. Энергия активации в различных филогенетических групп организмов.
15. Биологическая роль ферментов.
16. Класс гидролаз.
17. Фермент-субстратный комплекс. Связи, участвующие в его образовании. Доказательства образования фермент-субстратного комплекса.
18. Значение изучения кинетики ферментативных реакций. Основные понятия ферментативной кинетики. Скорость реакции. Закон действия масс. Константа скорости реакции.
19. Класс лигаз.
20. Общий кислотно-основной катализ. Ковалентный катализ. Связывание

- субстрата в "напряженной конфигурации". Эффект сближения и ориентации.
21. Энергия активации. Изменение свободной энергии для реакции различных типов.
  22. Определение энергии активации для отдельных стадий преобразования и распада фермент-субстратного комплекса.
  23. Получение кристаллических препаратов ферментов. Критерий чистоты ферментативных препаратов.
  24. Особенности ферментативного действия.
  25. Понятие константы Михаэлиса и максимальной скорости, их значения при исследовании механизма ферментативных реакций, методы их определения.
  26. Класс изомераз.
  27. Общая характеристика нуклеаз. Реакции, катализируемые рибонуклеазами.
  28. Механизмы двухсубстратных ферментативных реакций.
  29. Преимущество иммобилизованных ферментов. Носители, применяемые для иммобилизации ферментов.
  30. Обратимые конкурентные ингибиторы.
  31. Специфичность действия ферментов.
  32. Изоферменты. Ферментная система.
  33. Строение активного центра и механизм гидролитического действия лизоцима.
  34. Ингибирование ферментативной реакции субстратом и продуктами.
  35. Правила работы с ферментами. Хранение ферментных препаратов.
  36. Трансферазная функция лизоцима.
  37. Влияние температуры на скорость ферментативных реакций.
  38. Методы исследования ферментативного действия в живой клетке и ее отдельных структурных элементах.
  39. Типы реакций катализируемых никотинамиддинуклеотидными дегидрогеназами. Роль кофермента и белковой части.
  40. Понятия "ингибитор", классификация ингибиторов.
  41. Использование иммобилизованных ферментов в биотехнологии.
  42. Строение активного центра и механизм действия флавиновых ферментов.
  43. Применение ферментов в медицине. "Молекулярные" болезни.
  44. Класс оксидоредуктаз.

- 45.Стереохимическая специфичность действия ферментов.
- 46.Обратимые неконкурентные ингибиторы. Определение констант ингибирования.
- 47.Методы очистки ферментов.
- 48.Ковалентная модификация ферментов. Проферменты
- 49.Влияние концентрации водородных ионов на скорость ферментативных реакций.
- 50.Определение констант диссоциации ионогенных групп активного центра.
- 51.Методы изучения ферментативной активности.
- 52.Аллостерическая регуляция активности ферментов
- 53.Использование ферментов в промышленности.
- 54.Класс трансферраз.
- 55.Роль гормонов в регуляции активности ферментов.
- 56.Значение исследования рН на скорость ферментативных реакций. Возможные механизмы этого влияния.
- 57.Иммобилизованные ферменты.
- 58.Общее представление о механизме действия ферментов.
- 59.Роль субклеточных культур в регуляции действия ферментов. Обратимость действия ферментов. Антиферменты.
- 60.Ферменты в сельском хозяйстве. Инженерная энзимология. Перспективы использования ферментов.

### Самостоятельная работа обучающихся

Название разделов и тем	Вид самостоятельной работы	Объем в часах	Форма контроля
Краткие исторические сведения о развитии энзимологии. Возникновение понятия "ферментация"	проработка учебного материала, подготовка к сдаче зачета	4	собеседование
Значение энзимологии. Биологическая роль ферментов. Практическое применение ферментов	проработка учебного материала, подготовка к сдаче зачета	4	собеседование
Методы исследования	проработка	4	собеседование

ферментов. Методы очистки и выделения	учебного материала, подготовка к сдаче зачета		
Строение ферментов. Химическая природа ферментов	проработка учебного материала, подготовка к сдаче зачета	5	собеседование
Механизм действия ферментов. Общее понятие о катализе	проработка учебного материала, подготовка к сдаче зачета	5	собеседование
Строение активного центра и механизм действия рибонуклеазы. Общая характеристика рибонуклеаз. Строение и механизм действия лизоцима.	проработка учебного материала, подготовка к сдаче зачета	5	собеседование
Никотинамиддинуклеотидные дегидрогеназы. Флавиновые ферменты. Пиридоксальные ферменты	проработка учебного материала, подготовка к сдаче зачета	4	собеседование
Основные понятия ферментативной кинетики	проработка учебного материала, подготовка к сдаче зачета	4	собеседование
Влияние температуры и pH на скорость ферментативных реакций	проработка учебного материала, подготовка к сдаче зачета	4	собеседование
Понятие "ингибитор", классификация ингибиторов	проработка учебного материала, подготовка к сдаче зачета	4	собеседование
Регулирование активности ферментов	проработка учебного материала, подготовка к сдаче	4	собеседование

	зачета		
Номенклатура и классификация ферментов	проработка учебного материала, подготовка к сдаче зачета	4	собеседование

### Список рекомендуемой литературы:

1. Комов В.П. Биохимия : учебник. - М. : Дрофа, 2008
2. Руководство к лабораторным занятиям по органической химии: для 2 курса экол. фак. / Л. А. Михеева. – Ульяновск: УлГУ, 2006.
3. Чиркин А.А. Биохимия: учеб. руководство: учеб. пособие для студентов и магистрантов вузов по биол. и мед. спец. / Чиркин Александр Александрович, Е. О. Данченко. - М. : Мед. лит., 2010. - 624с.
4. Еникеев Э.Ш. Руководство для лабораторно-практических работ по биологической химии [Электронный ресурс]: электрон. учеб. курс: метод. пособие / Еникеев Э.Ш., Н.В. Терехина. – Электрон. текстовые дан. – Ульяновск: УлГУ, 2016. – 1 электрон.опт.диск (CD-ROM). – URL [ftp://10.2.96.134/Text/Enikeev\\_2016.pdf](ftp://10.2.96.134/Text/Enikeev_2016.pdf)